

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590174

研究課題名(和文) 肺癌化学療法におけるマイクロRNAのバイオマーカーへの応用研究

研究課題名(英文) Studies focused on discovery of micro RNA function for biomarkers in chemotherapy against lung cancer

研究代表者

柴山 良彦 (Shibayama, Yoshihiko)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90593822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA(miRNA)は遺伝子をコードしない短鎖RNAであり、相補的に結合するmRNAの蛋白質への翻訳を抑制し、様々な細胞の生理機能を調節する分子である。本研究では癌患者におけるmiRNAの発現および機能と、予後との関係について調べた。肺癌患者においてmiRNA101-5pの低発現では予後不良であること、大腸癌患者においてmiRNA124-5pの低発現では予後不良であることを見出した。miRNA101-5pを細胞内に導入すると細胞増殖が抑制された。miRNA101-5pは細胞増殖に関与し、癌の治療効果に影響していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA(miRNA) is a non-coding RNA that regulates protein synthesis by mRNA translations, which is critically involved in various physiological processes. We evaluated the relationship among survival in cancer patients, the expression level in patient's plasma and function of miRNAs. Lower miRNA101-5p expression levels were correlated with a lower probability of survival in lung cancer patient. Lower miRNA124-5p expression levels were also correlated with a lower probability of survival in colon cancer patients. The transfection of mimic miRNA124-5p into cancer cells inhibited cell growth. Our results indicate that expression levels of miRNA101-5p and miRNA124-5p related with survival; expression levels of miRNA101-5p and 124-5p may be used as biomarkers to determine the prognosis of cancer patients.

研究分野：医療薬学

キーワード：癌 マイクロRNA バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

がんは遺伝子の病気であり遺伝子配列や遺伝子発現の変化について様々な研究がなされてきたが、遺伝子の変異のみで説明できないがんの性質が明らかになりつつある。遺伝子をコードしない RNA が細胞内に存在することは知られていたが、それがどのような機能を有するのか長い間不明であった。遺伝子をコードしない RNA の 1 つ、約 20 塩基程度の短鎖 RNA であるマイクロ RNA (miRNA) が生物学的な機能を有することが明らかになり、がんの悪性化や発生など、細胞の機能を制御していることが知られるようになった。miRNA は相補的な配列を有する複数のメッセンジャー RNA (mRNA) とハイブリダイゼーションし、その mRNA を分解もしくは蛋白質への転写を抑制することで細胞機能を制御していることが知られている。

RNA は生体中に普遍に存在するリボヌクレアーゼにより容易に分解されるため、血漿中から RNA を分離することは困難であると考えられていた。細胞が分泌するエキソソームは RNA や蛋白質を含み、エキソソーム中では RNA は体液中においても安定して存在すること、分泌されたエキソソームは細胞に取り込まれ、エキソソーム中の RNA、蛋白質が取り込んだ細胞の中で機能し、細胞間の情報伝達を担っている可能性も示唆されている。

### 2. 研究の目的

Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) と milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8) はがんの悪性化やがん幹細胞など、がんの性質や機能に重要な役割を担っていることが報告されており<sup>1,2)</sup>、バイオマーカーとして応用できる可能性が報告されている。本研究ではがんの薬剤耐性と関係が示唆されている miRNA について、EZH2、MFGE8 の mRNA およびこの mRNA と相補的に結合する可能性が示唆されている miRNA について血漿中の発現量を治療後の生存率について調べた。生存率との関係が認められた miRNA については in vitro 実験によりその機能も調べた。

### 3. 研究の方法

(1) 実験材料 RNA の発現定量や機能解析などに用いた miScript microRNA Assay、QuantiTect primer assay、miScript RT kit、miScript SYBR Green PCR Kit、miScript miRNA mimics および AllStars Negative Control siRNA は株式会社キアゲン(東京)から購入した。ReverTra Ace、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix は東洋紡(大阪)から、High Pure RNA Isolation Kit はロシュ・アプライドサイエンス(東京)から購入した。ヒト大腸腺癌細胞 WiDr および COLO201 は医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク(大阪)より購入した。ダルベッコ変法 Eagle 培地 (DMEM)、Opti-MEM I、FBS、Antibiotic-Antimycotic、Lipofectamine 2000 はライフテクノロジ

ズ・ジャパン株式会社(東京)より購入した。Structural Maintenance Of Chromosomes 4 (SMC4) および Low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) の siRNA はそれぞれ (SMC4 センシ: GCCCAAGAAUGUGUAAACU、SMC4 アンチ: AGUUUACACAUUCUUGGGC)(LRP1B センシ: UUCCAACGGUUCUGUAUGUTT、LRP1B アンチ: ACAUACAGAACCGUUGGAATT)<sup>3)</sup> はグライナー・ジャパンから購入した。ISOGEN はニッポン・ジーン(東京)から購入した。その他の試薬は特級を使用した。

(2) 臨床研究 北海道大学病院、北海道がんセンター、札幌南三条病院で治療した 13 名の肺癌患者における血漿を分析した。内標準として RNU6B を用い、miRNA 16, 21, 26a, 34a, 98, 101, 101-5p, 124-5p, 126, 126-5p, 210, 217 および 630 の発現を評価した。また肺癌の予後との関連が報告されている EZH2 とがん幹細胞との関係が報告されている MFGE8 の mRNA も評価した。また北海道消化器科病院で治療した大腸癌患者の血漿についても同様の方法で分析した。分析に用いた血漿は化学療法実施前の検査のために採取した血液の残余から採取した。生存期間と無増悪生存期間については 2013 年 9 月 30 日までを観察期間とし、診療録から情報収集した。腫瘍増大の評価は RECIST ガイドライン V1.1 に準拠して効果判定した。診断時から進行ありに該当する時期までを無増悪生存期間とした。大腸癌に対する化学療法は大腸癌研究会の大腸癌治療ガイドライン 2010 年版<sup>4)</sup> に準拠して実施された。本研究は所属研究機関の倫理審査委員会において観察研究として承認を得て行った。

(3) 統計解析 それぞれの遺伝子発現において高発現群と低発現群の生存率については Kaplan-Meier 法および Log-Rank test を用いて、2 群間の平均値の比較は Mann-Whitney U test もしくは Student's t-test を用いて解析した。各遺伝子の発現の相関については単変量解析により相関性を調べた。

(4) RNA の抽出および発現定量 血漿 200 $\mu$ L あるいはホルマリン固定腫瘍切片から RNA をそれぞれ High Pure RNA Isolation Kit、High Pure RNA Paraffin Kit を用いて抽出した。RNA から miScript RT kit を用いて miRNA の cDNA を作成し、ReverTra Ace を用いて mRNA の cDNA を作成した。miRNA 発現量は miScript microRNA Assay を、mRNA 発現量は QuantiTect primer assay を用いて LightCycler480 system により定量した。miRNA の定量には U6<sup>5)</sup> を、mRNA の定量には  $\beta$ 2-microglobulin<sup>5)</sup> の発現量を内標準として相対的発現量を評価した。PCR 反応における Ct 値を求め、4 回測定した  $\Delta$ Ct ( $\Delta$ Ct = 内標準

Ct - 標的遺伝子 Ct) の平均値 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) 相対的発現量とした<sup>6)</sup>。培養細胞からは ISOGEN により総 RNA を抽出し、同様の方法で cDNA を作成し、発現量の定量を行った。同様に Ct 値を測定し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  値を相対的発現量とした ( $\Delta\Delta Ct =$  コントロール群  $\Delta Ct$  の平均値 - 処置群  $\Delta Ct$ )。

(5) In vitro 実験 WiDr あるいは COLO201 細胞は 10% FBS および 100 倍希釈 Antibiotic-Antimycotic 含有 DMEM を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。細胞増殖のレベルは MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] アッセイ法により評価した。96 well plate に  $1.0 \times 10^4$  cells / mL に調製した細胞を各ウェルに 90  $\mu$ L 分注した。Lipofectamine 2000 の説明書に従い、siRNA および miScript miRNA mimics を希釈し、72 時間培養した。5 mg / mL MTT 溶液を 10  $\mu$ L / well 添加し、4 時間後に 20% SDS を 100  $\mu$ L / well 添加し、遮光下 5 時間振とうし、マイクロプレートリーダーを用いて 570 nm で吸光度を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 肺癌患者における miRNA 発現と全生存率との関係 miRNA 101-5p の発現レベルについて中央値で、高値群と低値群の 2 群に分けて生存率を比較した。低発現患者では高発現群の患者と比較して全生存率が有意に低下することが認められた。他の miRNA では発現量と全生存率に相関は認められなかった。

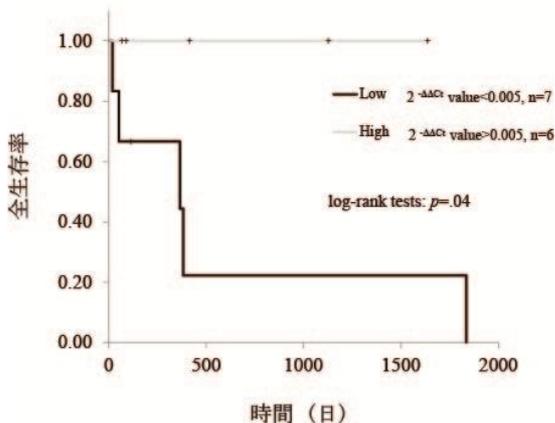


図1 肺癌患者における血漿中 miRNA 101-5p の高および低発現群の全生存率 Kaplan-Meier 曲線 miRNA 101-5p 発現量の中央値で 2 群に分割し全生存率を評価した。log-rank tests により統計学的有意差を検定した。実線は低発現群、点線は高発現群を、曲線状の + は観察期間打ち切り示す。

(2) 大腸癌患者における完全切除後の患者と切除不能患者における RNA 発現量 血漿中 miRNA と mRNA の発現量について評価した。MFGE8 の発現量が完全切除群の患者において切除不能の患者群より有意に低いこ

とが認められた (切除不能群:  $0.033 \pm 0.076$  完全切除群:  $0.014 \pm 0.019$ 、平均値 $\pm$ 標準偏差)。EZH2 および分析した miRNA の発現量には有意差は認められなかった。

(3) miRNA 26a および miRNA 124-5p 発現量と全生存率との関係 miRNA 26a の高発現患者では低発現群の患者と比較して全生存率が有意に低下し (図 2)、miRNA 124-5p の低発現患者では高発現群の患者と比較して全生存率が有意に低下することが認められた (図 3)。無増悪生存期間については miRNA 26a、miRNA 124-5p とも有意差は認められなかった。他の miRNA では発現量と全生存率、無増悪生存期間とも相関は認められなかった。

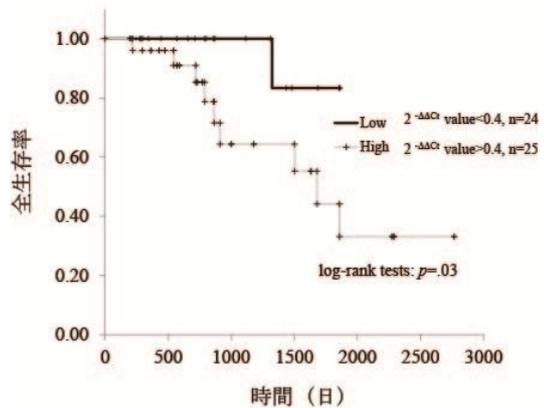


図2 大腸癌患者における血漿中 miRNA 26a の高および低発現群の全生存率 Kaplan-Meier 曲線 miRNA 26a 発現量の中央値で 2 群に分割し全生存率を評価した。log-rank tests により統計学的有意差を検定した。実線は低発現群、点線は高発現群を、曲線状の + は観察期間打ち切り示す。

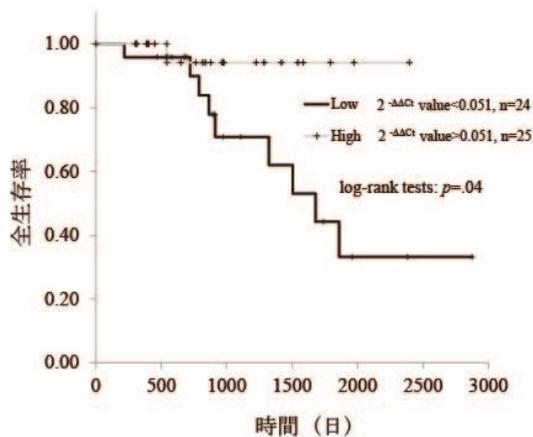


図3 大腸癌患者における血漿中 miRNA 124-5p の高および低発現群の全生存率 Kaplan-Meier 曲線 miRNA 124-5p 発現量の中央値で 2 群に分割し全生存率を評価した。log-rank tests により統計学的有意差を検定した。実線は低発現群、点線は高発現群を、曲線状の + は観察期間打ち切り示す。

(4) miRNA 124-5p の前駆体導入による細胞

機能への影響 miRNA 124-5p の前駆体を培養細胞に導入すると SMC4 の mRNA 発現は有意に低下した (WiDr:  $0.678 \pm 0.027$ , COLO201:  $0.276 \pm 0.035$ , 対照群の発現を 1 としたときの発現量 $\pm$ 標準誤差を示す)。また、LRP1B の mRNA 発現量も有意に低下した (WiDr:  $0.599 \pm 0.035$ )。miRNA 124-5p 前駆体あるいは SMC4 siRNA 導入により WiDr の細胞増殖が有意に低下することも認められたが、LRP1B の siRNA 導入による影響は認められなかった (miRNA124-5p mimic:  $0.881 \pm 0.022$ , SMC4 siRNA:  $0.878 \pm 0.016$ , LRP1B siRNA:  $0.939 \pm 0.013$ , 対照群の吸光度を 1 としたときの相対吸光度 $\pm$ 標準誤差を示す)。

(5) 考察 血漿中の RNA について発現量を評価し、全生存率、無増悪生存期間との関係について評価した。肺癌患者において miRNA 101-5p の低発現患者では予後不良であった。miRNA 101-5p の機能はほとんど報告が無く、肺癌との関係は不明である。miRNA 101-5p と相補的に結合する可能性の高い mRNA には sarcoglycan, beta、Yipl domain family, member 6 などがパイオインフォマティクスのデータベース (microRNA.org) 上で示唆されているが、お互いが実際に相互作用するかは不明であり、上記の 2 つの遺伝子ともがんにおける役割は不明である。EZH2 は肺癌のバイオマーカーとして応用できる可能性が示唆されているが、血漿中 EZH2 発現と予後との関係は認められなかった。miRNA 101 と EZH2 はそれぞれ相補的に結合し、miRNA 101 は EZH2 発現を抑制することが報告されているが<sup>7)</sup>血漿中の発現には相関は認められなかった。

切除不能の大腸癌患者において完全切除した患者より優位に MFGE8 の発現が上昇していたが、MFGE8 はがん幹細胞の活性化に関与していること<sup>2)</sup>予後不良因子となりうること<sup>8)</sup>も報告されていることから、血漿中 MFGE8 はがんのバイオマーカーとして応用できる可能性が考えられる。miRNA 26a は EZH2 を介して転移を抑制するとの報告<sup>9)</sup>がある一方で、神経膠腫の増殖を抑制するという報告<sup>10)</sup>もあり、大腸癌での miRNA 26a の機能や血漿中 miRNA のバイオマーカーとしての応用はさらなる研究が必要と考えられた。

miRNA 124-5p (miRBase ID: hsa-miR-124-5p) の機能はほとんど不明であるが、miR-124-5p はリンパ節転移を生じた胃癌において発現が低下している<sup>11)</sup>との報告があり、リンパ節転移を生じた癌は進行した状態であることから、miRNA 124-5p の発現低下はがんの転移を生じやすくする可能性がある。本研究でも miRNA 124-5p の発現が低かった患者群において予後不良であったことから miRNA 124-5p はがんの転移や悪性度に影響を及ぼしている可能性が考えられた。心臓の拡張障害患者において血漿中 miRNA

124-5p の発現が低く、拡張型心筋症では高くなることが報告<sup>12)</sup>されていることから miRNA 124-5p は心臓の機能や細胞の運動などに関与している可能性も考えられる。パイオインフォマティクスのデータベース (microRNA.org) では LRP1B が miRNA 124-5p と最もハイブリダイゼーションする可能性の高い mRNA であることが示されている。LRP1B の発現低下により細胞の移動能力が亢進することが報告されている<sup>13)</sup>。本研究の結果は miRNA 124-5p の導入により LRP1B の mRNA が低下することを示しており、miRNA 124-5p の発現レベルが腫瘍細胞の浸潤・転移に影響を及ぼす可能性が考えられる。miRNA 124-5p の導入により細胞増殖が抑制されたが、この結果は miRNA 124-5p の高発現群において予後良好であった臨床研究の結果を支持する結果であると考えられた。

MiRNA 124-5p は SMC4 の mRNA を抑制することが示唆された。SMC4 は染色体の凝集構造を維持する蛋白質複合体であるコンデンシンの構成分子の 1 つである。悪性腫瘍の特徴として、染色体数の異常や部分的な欠損、増幅など、染色体不安定性 (CIN) が生じる。CIN は染色体分離の制御機構に異常があることにより生じることが知られているが、コンデンシンは染色体分離を制御する重要な分子であるため、miRNA 124-5p の発現異常は CIN の発生に関与している可能性が考えられる。miRNA 124-5p と CIN の関係について、今後の研究の発展が期待される。

#### 参考文献

- 1) Kikuchi J, et al., Distinctive expression of the polycomb group proteins Bmi1 polycomb ring finger oncogene and enhancer of zeste homolog 2 in nonsmall cell lung cancers and their clinical and clinicopathologic significance. *Cancer* 2010; 116:3015-24.
- 2) Jinushi M, et al., Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:12425-30.
- 3) Ni S, et al., Down expression of LRP1B promotes cell migration via RhoA/Cdc42 pathway and actin cytoskeleton remodeling in renal cell cancer. *Cancer Sci* 2013; 104:817-25.
- 4) Watanabe T, et al., Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 2012; 17:1-29.
- 5) Fukao T, et al., An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell* 2007; 129:617-31.
- 6) Dalle Carbonare L, et al., Runx2 mRNA expression in the tissue, serum, and circulating non-hematopoietic cells of patients with thyroid

cancer. J Clin Endocrinol Metab 2012; 97:E1249-56.

7) Paul C, et al., MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$ . Mol Cancer 2010; 9: 108.

8) Oba J, et al., Expression of milk fat globule epidermal growth factor-VIII may be an indicator of poor prognosis in malignant melanoma. Br J Dermatol 2011; 165: 506-12.

9) Yu L, et al., miR-26a inhibits invasion and metastasis of nasopharyngeal cancer by targeting EZH2. Oncol Lett 2013; 5:1223-8.

10) Qian X, et al., MicroRNA-26a Promotes Tumor Growth and Angiogenesis in Glioma by Directly Targeting Prohibitin. CNS Neurosci Ther 2013 10; 804-12.

11) Yang B, et al., Identification of microRNAs associated with lymphangiogenesis in human gastric cancer. Clin Transl Oncol 2013; 11: Jul 24.

12) Nair N, et al., Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction. Mol Cell Biochem 2013; 376: 33-40.

13) Ni S, et al., Down expression of LRP1B promotes cell migration via RhoA/Cdc42 pathway and actin cytoskeleton remodeling in renal cell cancer. Cancer Sci 2013; 104:817-25.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Takafumi Jinushi, Yoshihiko Shibayama, Ichiro Kinoshita, Satoshi Oizumi, Masahisa Jinushi, Tadahiro Aota, Toshiyuki Takahashi, Shoichi Horita, Hirotohi Dosaka-Akita and Ken Iseki

Low expression levels of microRNA-124-5p correlated with poor prognosis in colorectal cancer via targeting of SMC4. Cancer Medicine, PEER REVIEWED, 3, 2014, 1544-1552.

DOI: 10.1002/cam4.309

柴山 良彦、地主 隆文、木下 一郎、玉木 慎也、青田 忠博、堀田 彰一、佐藤 秀紀、石井 理砂、大泉 聡史、地主 将久、高崎 雅彦、山田 武宏、秋田 弘俊、井関 健

肺癌および大腸癌患者における血漿中マイクロ RNA の発現：バイオマーカー開発のための探索研究、臨床薬理の進歩 2014 別冊、査読有、2014、106-113.

〔学会発表〕(計3件)

柴山 良彦、地主 隆文、青田 忠博、堀田 彰一、井関 健、Expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a screening for a potential biomarker、第 11 回日

本臨床腫瘍学会学術集会、仙台市、2013 年 8 月 29 日、仙台国際センター。

柴山 良彦、地主 隆文、青田 忠博、堀田 彰一、井関 健、大腸癌患者における血漿中マイクロ RNA の発現：バイオマーカー開発のための探索研究、日本薬学会第 134 回年会、熊本市、2014 年 3 月 28 日、熊本大学。

柴山 良彦、地主 隆文、青田 忠博、堀田 彰一、井関 健、MicroRNA-124-5p is associated with prognosis in colon cancer via targeting the structural maintenance of chromosomes 4、第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会、福岡市、2014 年 7 月 18 日、福岡国際センター。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

柴山 良彦 (SHIBAYAMA, Yoshihiko)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：90593822

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

井関 健 (ISEKI, Ken)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40203062

秋田 弘俊 (AKITA, Hirotohi)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70222528